

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005677

International filing date: 28 March 2005 (28.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-200862
Filing date: 07 July 2004 (07.07.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 14 July 2005 (14.07.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

20.6.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2004年 7月 7日

出 願 番 号
Application Number: 特願2004-200862

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

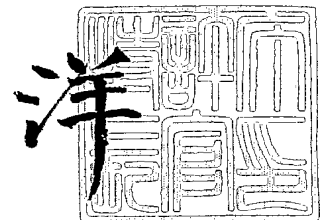
JP2004-200862

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所
特許技術開発株式会社

2005年 6月10日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 PPTD04-008
【提出日】 平成16年 7月 7日
【あて先】 特許庁長官 小川 洋殿
【国際特許分類】 A61K 7/06
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番地1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
 【氏名】 岡 修一
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番地1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
 【氏名】 鶴田 明稚
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都新宿区余丁町14-4 NH市ヶ谷ビル3階 特許技術開発株式会社内
 【氏名】 鈴木 三男
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都新宿区余丁町14-4 NH市ヶ谷ビル3階 特許技術開発株式会社内
 【氏名】 中里 敏
【特許出願人】
 【識別番号】 301021533
 【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所
 【代表者】 吉川 弘之
【特許出願人】
 【識別番号】 502316706
 【氏名又は名称】 特許技術開発株式会社
 【代表者】 阿形 明
【代理人】
 【識別番号】 100095153
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 水口 崇敏
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 214010
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

プロリルイソロイシルグリシル単位又はイソロイシルグリシルセリル単位を含むことを特徴とするトリペプチド又はテトラペプチド及びそれらの塩。

【請求項 2】

プロリルイソロイシルグリシンである請求項 1 記載のトリペプチド及びその塩。

【請求項 3】

イソロイシルグリシルセリンである請求項 1 記載のトリペプチド及びその塩。

【請求項 4】

プロリルイソロイシルグリシル単位とグリシル単位又はセリル単位から構成されたテトラペプチド及びその塩。

【請求項 5】

グリシルプロリルイソロイシルグリシンである請求項 4 記載のテトラペプチド及びその塩。

【請求項 6】

プロリルイソロイシルグリシルセリンである請求項 4 記載のテトラペプチド及びその塩。

【請求項 7】

請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のトリペプチド、テトラペプチド及びそれらの塩の中から選ばれた少なくとも 1 種を有効成分とする上皮系細胞増殖促進剤。

【請求項 8】

育毛剤として使用する請求項 7 記載の上皮系細胞増殖促進剤。

【請求項 9】

育毛剤が毛髪休止期に作用する請求項 8 記載の上皮系細胞増殖促進剤。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規オリゴペプチド及びそれを用いた上皮系細胞増殖促進剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、育毛促進効果、皮膚再生促進効果、皮膚潰瘍治療効果、粘膜損傷治療効果などの上皮系細胞増殖促進効果を有する新規なオリゴペプチド、さらに詳しくいえば3個又は4個のアミノ酸単位からなるオリゴペプチド、その塩及びそれらを有効成分とする上皮系細胞増殖促進剤に関するものである。

【背景技術】

【0002】

最近、発毛、脱毛の制御機構（メカニズム）が明らかにされるとともに、育毛剤に対する社会的関心が強まり、育毛作用を有する新規化合物、遺伝子研究に基づく成分、漢方の組合せなど種々の新しい育毛剤が提案されている。

【0003】

図1は、発毛、脱毛を繰り返す毛髪（ヘアサイクル）を示す説明図であるが、通常の毛髪はその本体1の毛根部2に毛乳頭3を有し、その上部に毛母細胞4を備えており、成長後毛髪本体1は退縮期（Catagen）となり、約2～3週間で成長が停止し、その後2～3か月間休止期（Telogen）に入る。その間に毛根部2は活動を続け、新しい毛髪本体1'を発生する。この新しい毛髪本体1'は引き続き成長期（Anagen）に入り、古い毛髪本体1を脱毛させて、さらに成長を維持し、約5～6年で元の毛髪を再生する。

【0004】

育毛剤は、このようなヘアサイクルの各時期において、毛母細胞の増殖を促進し、休止期において成長期を誘導したり、成長期を延長したり、退縮期への移行を遅延させる作用を有し、発毛の促進又は脱毛の抑制を行わせるものである。

【0005】

そして、このような育毛剤として、これまでに、例えば6-(1-ピペリジニル)-2,4-ピリミジンジアミン-3-オキシド（ミノキシジル）を有効成分とした育毛剤（特許文献1参照）、ミノキシジル1～6質量%と、多価アルコール、エタノール、塩酸ピリドキシン及び水を含有してなる育毛組成物（特許文献2参照）、繊維芽細胞増殖因子-10（FGF-10）を有効成分として含む育毛剤（特許文献3参照）、特定の脂肪酸エステル、エーテル、モノグリセリド硫酸エステル塩又はモノアルキルグリセリルエーテル硫酸エステル塩を有効成分とする養毛剤（特許文献4参照）、CRF1受容体アンタゴニストを有効成分とする育毛剤（特許文献5参照）、血行促進効果を有する生薬抽出物とビタミン又はその誘導体とを有効成分とし、水溶性高分子が配合されてゲル化されたエアゾール用組成物と、噴射剤とを含有する育毛用エアゾール製剤（特許文献6参照）などが提案されている。

【0006】

また、特殊なものとして、式 $R^1\text{-Met-Ile-XR}^2$ （式中、XはTrp、Phe、Trp-Leu、Phe-Leu、Tyr-Leu、Ile-Leu又はLeu-Leuであり、 R^1 は水素原子、アミノ基の保護基、 R^2 はヒドロキシ又はカルボキシル基の保護基である）で表わされるペプチド又は薬理的に許容される塩を有効成分とする経口育毛剤が知られている（特許文献7参照）。

そのほか、極く最近の新聞情報として、6-ベンジルアミノプリン（サイトプリン）とペンタデカンとを組み合わせた育毛剤「薬用毛髪力 イノベート」の発売が報じられている（非特許文献1参照）。

【0007】

これらの育毛剤は、それぞれ長所を有し、かなりの効果が認められているものもあるが、すべての症状に対して完全に対応し得るものではない上に、原料の入手が困難なものもあり、実用に供するには必ずしも満足できるものとはいえない。このため、この分野にお

いてはさらに優れた効果を発揮する新規な育毛剤の出現が要望されている。

【0008】

他方、オリゴペプチド又はその重合物を有効成分とする生理活性物質としては、コラーゲン又はゼラチンのコラーゲナーゼによる分解物中のグリシン残基1個とそれ以外のアミノ酸残基2個とから構成されるトリペプチドの、平均分子量280~20000をもつ重合体からなる老化防止のための皮膚外用剤（特許文献8参照）、（G l y - A l a - A r g）、（G l y - A l a - H y p）、（G l y - A l a - L y s）、（G l y - P r o - A l a）、（G l y - P r o - A r g）、（G l y - P r o - H y p）及び（G l y - P r o - S e r）のトリペプチドの混合物を有効成分とするコラーゲン産生促進剤（特許文献9参照）などが知られているが、トリペプチドを有効成分とする上皮系細胞増殖促進剤はこれまで知られていない。

【0009】

【特許文献1】 米国特許第4139619号明細書（特許請求の範囲その他）

【特許文献2】 特開2002-326913号公報（特許請求の範囲その他）

【特許文献3】 特開平10-279501号公報（特許請求の範囲その他）

【特許文献4】 特開平11-246359号公報（特許請求の範囲その他）

【特許文献5】 国際公開第02/019975号パンフレット（特許請求の範囲その他）

【特許文献6】 特開平7-101834号公報（特許請求の範囲その他）

【特許文献7】 国際公開第00/29425号パンフレット（特許請求の範囲その他）

【特許文献8】 特開2000-309521号公報（特許請求の範囲その他）

【特許文献9】 特開2003-137807号公報（特許請求の範囲その他）

【非特許文献1】 日経産業新聞、平成16年3月2日

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、比較的簡単に製造することができ、育毛作用のみではなく、皮膚再生のような上皮系細胞増殖促進作用を有する上に、角質層を容易に通過して所望のターゲット細胞に達して効果を発揮し得る新規なオリゴペプチドを提供することを目的としてなされたものである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは育毛剤として有用な化学物質を開発するために鋭意研究を重ねた結果、バチルス（B a c i l l u s）属バクテリアの培養上清の抽出物中に、優れた育毛効果を示す活性物質が存在することを見出し、先にこの知見に基づき、ペントペプチドからなる上皮系細胞増殖促進剤を提供したが（特願2004-108449号）、さらに研究を進めた結果、特定のアミノ酸単位をもつトリペプチド及びテトラペプチドが上記のペントペプチドに匹敵する、或いはより優れた上皮系細胞増殖促進作用を示すことを見出した。本発明は、この知見に基づいてなされたものである。

【0012】

すなわち、本発明は、プロリルイソロイシルグリシル単位又はイソロイシルグリシルセリン単位を含むことを特徴とするトリペプチド又はテトラペプチド及びそれらの塩と、そのトリペプチド、テトラペプチド及びそれらの塩の中から選ばれた少なくとも1種を有効成分とする上皮系細胞増殖促進剤を提供するものである。

【0013】

本発明の上皮系細胞増殖剤におけるオリゴペプチドすなわちトリ又はテトラペプチドの作用は、これらのオリゴペプチドそのものだけでなく、このオリゴペプチド単位をその分子構成単位として有するポリペプチドにおいても発揮されるが、分子量が500以上になると水に難溶になるので育毛剤としては好ましくない。

【0014】

このようなトリペプチドとしては、イソロイシルグリシルセリン、プロリルイソロイシルグリシンがある。またテトラペプチドとしては、例えばこのトリペプチドの前にグリシル、アラニル、アルギニル、アスパラギル、リジル、セリル、バリル又はグルタミル基などのアミノ酸残基が結合したもの及びこのトリペプチドの後にこれらのアミノ酸残基が結合したものを挙げることができるが、好ましいのはグリシルプロリルイソロイシルグリシン及びプロリルイソロイシルグリシルセリンである。

【0015】

これらのトリペプチド又はテトラペプチドは、遊離形のものであってもよいし、また塩であってよい。この塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩などがある。

【0016】

本発明のオリゴペプチドは、ポリペプチド合成の際にペプチド結合を形成する場合に慣用されている方法、例えば縮合剤法、活性エステル法、アジド法、混合酸無水物法などにより α -アミノ基を保護した原料アミノ酸とカルボキシル基を保護したアミノ酸とを反応させてペプチドを形成したのち、保護基を脱離する工程を繰り返すことによって製造することができる。

【0017】

この縮合剤法は、最も一般的なペプチド結合の形成方法であって、この際の縮合剤としては、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC)、N-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド(WSCI)及びその塩酸塩(WSCI·HCl)、ベンゾトリアゾール-1-イル-トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリ化物塩(BOP)、ジフェニルホスホリルジアジド(DPPA)などを単独で、或いは、N-ヒドロキシスクシンイミド(HONSu)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、又は3-ヒドロキシ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-1,2,3-ベンゾトリアジン(HOObt)と組み合わせて用いる。

【0018】

活性エステル法における活性エステルとしては、例えばp-ニトロフェニルエステル(ONp)、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(ONSu)、ペンタフルオロフェニルエステル(OPfp)などを用いる。

また、アジド法は、アミノ酸又はペプチドに無水ヒドラジンを反応させて対応するヒドラジドを形成させる方法であり、ラセミ化の少ないセグメント縮合法として知られている。

【0019】

さらに、混合酸無水物法は、イソブチルオキシカルボニルクロリド、塩化ジエチルアセチル、塩化トリメチルアセチルなどを用いてアミノ酸のカルボキシル基の混合無水物を形成させる方法で、低温においてカルボキシル基を強力に活性化できるので有利である。

【0020】

他方、アミノ酸の保護基としては、酸処理や加水分解や接触還元により容易に脱離するものが用いられる。このような保護基のうち α -アミノ基の保護基としては、ベンジルオキシカルボニル基、tert-ブトキシカルボニル基、9-フルオレニルメトキシカルボニル基、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基、メトキシベンジルオキシカルボニル基などがある。また、カルボキシル基を保護するには、メチル又はエチルエステル、ベンジルエステル、tert-ブチルエステル、フェナシルエステルなどを形成させる。

【0021】

また、側鎖にヒドロキシル基をもつ α -アミノ酸の場合は、このヒドロキシル基を保護する必要があるが、この保護基としては、白金黒触媒による接触還元や強酸処理により容易に脱離されるベンジル基や弱酸処理により容易に脱離されるtert-ブチル基が好適である。

このような α -アミノ酸エステル、アミノ基やヒドロキシル基を保護された原料アミノ酸は、市販品として容易に入手可能である。

【0022】

本発明のオリゴペプチドの製造は、原料アミノ酸又はその誘導体を溶媒中に均一に溶解して反応させる液相法、不溶性の樹脂上でペプチド鎖を伸長させていく固相法のいずれでも行うことができるが、自動固相合成装置を用いて行うのが有利である。この方法によると、所望のオリゴペプチドを短時間に、しかも高純度で得ることができる。

【0023】

本発明の新規オリゴペプチド又はその塩は、ラセミ体として得られるが、所望ならば、慣用の方法により光学分割して光学活性を有するものとして得ることもできる。この光学分割は、ラセミ体のアミノ酸を適当な光学活性物質とのジアステレオマーを形成させ、これを分別結晶する方法、酵素を用いる方法又はキラルな担体を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による方法などで行うことができる。

【0024】

本発明のオリゴペプチドは、水又はアルコール類に可溶である。このものは、質量分析、赤外吸収スペクトル、高速液体クロマトグラフィーにより、同定することができる。

【0025】

本発明のオリゴペプチドは、毛包上皮細胞、特に毛母細胞を直接的に増殖促進させる作用、すなわち育毛作用を有するほかに、培養皮膚移植、皮膚潰瘍、皮膚欠損創の再生作用を有するので、上皮系細胞増殖促進剤として用いることができる。

【0026】

本発明の上皮系細胞増殖促進剤の製剤は、有効成分となる前記オリゴペプチドを、水性媒質に0.0001～5質量%の濃度で溶解することにより行われる。この際用いる水性媒質としては、水と水溶性有機溶剤との混合溶媒が好ましい。

【0027】

水溶性有機溶剤としては、例えばエチルアルコールのようなアルコール類、エチレングリコール、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、グリセリン、1,3-ブチレングリコールのような多価アルコール類、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドのような極性有機溶剤などが用いられる。これらは単独で用いてもよいし、2種以上組み合わせ用いてもよい。好ましい水性溶媒は、水とプロピレングリコールとエチルアルコールとの混合溶媒である。

【0028】

この本発明の上皮系細胞増殖促進剤には、所望に応じ他の育毛作用を有する化合物例えばミノキシジル、塩化カルプロニウム、ペンタデカン酸グリセリド、酢酸トコフェロール、ピロクトンオラミン、グリチルリチン酸、イソプロピルメチルフェノール、ヒノキチオール、センブリ抽出液、トウガラシチンキやビタミン類例えばビタミンA、ビタミンB、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンF、ビタミンH、ビタミンK、ビタミンP、ビタミンU、パントテニルアルコール、カルチニン、フェルラ酸、 γ -オリザノール、リポ酸、オロツト酸又はそれらの誘導体と併用することができる。これらの化合物は、製剤中に0.005～10質量%、好ましくは0.01～2.0質量%の範囲の量で配合される。

【0029】

本発明の上皮系細胞増殖促進剤には、さらに所望に応じ、香料、着色剤、pH調整剤、殺菌剤、界面活性剤、噴射剤など、通常の外用液剤に慣用されている添加剤を加えることができる。これら添加剤の量としては、0.001～5質量%、好ましくは0.01～2.0質量%の範囲が好ましい。

【0030】

本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、頭部又は患部に、1日1～5回程度塗布を繰り返して使用される。

本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、毛包上皮細胞の増殖を用量依存的に促進させること

からみて、この中の有効成分であるオリゴペプチドが上皮系細胞増殖促進効果を有することを確認することができた。

また、本発明のオリゴペプチドは上皮細胞に対して、選択的に増殖作用を示すので、他の細胞に対し、例えばガン化などの悪影響を与えるおそれがなく有利である。

【発明の効果】

【0031】

本発明によると、育毛効果のみでなく、皮膚再生効果、アトピー性皮膚炎治療効果を奏する優れた新規な上皮系細胞増殖促進剤が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

次に実施例によって本発明を実施するための最良の形態を説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

【実施例1】

【0033】

自動固相合成装置（マルチシンテック社製、製品名「S y r o 2 0 0 0」）を用い、かつ溶媒としてテトラヒドロフランを、縮合剤としてジシクロヘキシルカルボジイミドをそれぞれ用い、トリエチルアミンの存在下、ヒドロキシル基を *tert*-ブチル基で保護したセリンのベンジルエステルと、 α -アミノ基を 9-フルオレニルメトキシカルボニル基（以下 Fmoc 基と略す）で保護したグリシンと、 α -アミノ基を Fmoc 基で保護したイソロイシンとを順次反応させて、N-Fmoc-イソロイシルグリシルセリンのベンジルエステルを製造した。

【0034】

反応終了後、生成中間体をメチルアルコールとジオキサンとの混合溶媒（体積比 3 : 1）の中でフッ化水素酸で処理しクロマトグラフィーで精製することにより保護基の脱離とエステルの加水分解を行ったのち、ラセミ型イソロイシルグリシルセリンを得た。この場合の収率は約 46% であった。

【0035】

次に、このトリペプチドを C₁₈ カラム [ヒューレットパッカード社製、製品名「H P 1 1 0 0」(3.0×250 mm)] (以下すべての純度解析に本カラムを用いた。) に通し、吸着した成分を 0.1% トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度 0~30% の範囲の溶液により、流速 0.4 ml/分、20 分間で溶出させた。その結果、トリペプチドは保持時間 11.671 分で溶出され、純度は 95.87% であった。

【0036】

また、このトリペプチドの質量を、MALDI-MS 質量計 [テルモバイオアナリシス社製、製品名「D y n a m o」(以下すべての質量分析に本質量計を用いた。)] で分析した結果、質量 (m/z , MH^+) は m/z 275.339 であることが分った。この質量分析の結果を図 2 に示す。

【実施例2】

【0037】

グリシンのベンジルエステルと α -アミノ基を Fmoc 基で保護したイソロイシンと、 α -アミノ基を Fmoc 基で保護したプロリンとを用い、実施例 1 と全く同様に操作してラセミ型プロリルイソロイシルグリシンを製造した。この場合の収率は約 40% であった。

【0038】

次に、このトリペプチドを C₁₈ カラムに通し、吸着した成分を 0.1% トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度 0~30% の範囲の溶液により、流速 0.4 ml/分、20 分間で溶出させた。その結果、トリペプチドは保持時間 14.052 分で溶出され、純度は 95.93% であった。

【0039】

また、このトリペプチドの質量を分析した結果、質量 (m/z , MH^+) は m/z 28

5. 102であった。この質量分析の結果を図3に示す。

【実施例3】

【0040】

ヒドロキシシル基をtert-ブチル基で保護したセリンのベンジルエステルと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したグリシンと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したイソロイシンと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したプロリンとを用い、実施例1と全く同様に操作して、ラセミ型プロリルイソロイシルグリシルセリンを得た。この場合の収率は約54%であった。

【0041】

次に、このテトラペプチドをC₁₈カラムに通し、吸着した成分を0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度0~40%の範囲の溶液により、流速0.4ml/分、20分間で溶出させた。その結果、テトラペプチドは保持時間12.313分で溶出され、純度は95.11%であった。

【0042】

また、このテトラペプチドの質量を分析した結果、質量(m/z 、 MH^+)は m/z 73.963であることが分った。この質量分析の結果を図4に示す。

【実施例4】

【0043】

グリシンのベンジルエステルと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したイソロイシンと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したプロリンと、 α -アミノ基をFmoc基で保護したグリシンとを用い、実施例1と全く同様に操作して、ラセミ型グリシルプロリルイソロイシルグリシンを製造した。この場合の収率は約48%であった。

【0044】

次に、このテトラペプチドをC₁₈カラムに通し、吸着した成分を0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度5~40%の範囲の溶液により、流速0.4ml/分、20分間で溶出させた。その結果、テトラペプチドは保持時間11.648分で溶出され、純度は99.60%であった。

【0045】

また、このテトラペプチドの質量を分析した結果、質量(m/z 、 MH^+)は m/z 43.986であった。この質量分析の結果を図5に示す。

【実施例5】

【0046】

本発明の上皮系細胞増殖促進剤について、マウスの毛包上皮細胞についての細胞増殖試験を行った。

なお、培養培地、試験培地としては、以下のものを用いた。

【0047】

(a) 培養培地

DMEM (シグマ社製、製品記号「D-5523」)

FBS (カンセラ・インターナショナル・インコーポレーテッド社製、製品記号「10100756」) 10%

ペニシリン/ストレプトマイシン (ギブコ社製、製品記号「15140-122」) 1%

(b) 試験培地

MCDB153 (シグマ社製、製品記号「M7403」)

インシュリン (シグマ社製、ウシ由来、製品記号「16634」)

5 μ g/ml

アポートルانسフェリン (シグマ社製、ヒト由来、製品記号「T1147」)

10 μ g/ml

EGF (アップステート・バイオテクノロジー社製、マウス由来、製品記号「01-101」) 5 ng/ml

BPE (ギプロ社製、ウシ下垂体抽出物、製品記号「13028-014」)

35 $\mu\text{g}/\text{ml}$

水溶性ヒドロコチゾン (ナカライ社製、製品記号「174-00」)

0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

エタノールアミン (和光社製、製品記号「012-12455」)

100 μM

o-ホスホリルエタノールアミン (シグマ社製、製品記号「P0503」)

100 μM

【0048】

(1) 毛包上皮細胞の分離及び培養

新生仔マウス (生後5日齢) の皮膚から手術メスを用いて約2mm幅の短冊状に皮膚片を切り出し、5%濃度でFBS (カンセラ・インターナショナル・インコーポレーテッド社製、製品記号「10100756」) を含むDMEM (シグマ社製、製品記号「D-5523」) 中に500 U/mlの割合で、デイスパーゼ (合同酒精社製、ロット番号0101) を溶解した溶液中に浸漬し、4℃において16時間静置した。次いでピンセットを用いて皮膚片から表皮を剥離除去し、真皮組織のみを採取し、このようにして得た真皮組織をPBS (-) (シグマ社製、製品記号「P-4417」) に浸し、眼科バサミを用いて細切した。このようにして得たストリップ片を、5%濃度でFBSを含むDMEM中に、0.2%濃度でコラーゲナーゼ (新田社製、ロット番号001014W) を溶解した溶液中に浸し、37℃において1時間消化したのち、1000 rpmで5分間遠心分離して上清を除去し、残分にPBS (-) を加えてゆるやかにピペッティングすることにより真皮懸濁液を調製した。

【0049】

次いで、この真皮懸濁液中から真皮繊維芽細胞と毛球を分離するため、15分間静置させて毛球のみを沈殿させた。この「静置→沈殿」の操作を3回行って得られた毛球を、2.65 mM EDTA水溶液中に0.25%濃度のトリプシンを溶かした液に浸し、37℃において5分間処理することにより毛包上皮細胞の分散溶液を調製した。

次に、この分散液を1000 rpmで5分間遠心分離し、遠心分離後上清を除去した。得られた毛包上皮細胞を培養培地に分散させ、コラーゲンコートした96穴マイクロプレートに播種し、5% CO₂を含む雰囲気中、37℃で培養した。

【0050】

(2) 細胞増殖試験

(i) 試料の調製

実施例1~4で得たイソロイシルグリシルセリン (以下IGSと略記する)、プロリルイソロイシルグリシン (以下PIGと略記する)、プロリルイソロイシルグリシルセリン (以下PIGSと略記する) 及びグリシルプロリルイソロイシルグリシン (以下GPIGと略記する) をそれぞれ試験培地に溶解し、いずれも0.3 μM 、1 μM 、3 μM 、10 μM 、30 μM 及び100 μM の6種類の濃度の試料を調製した。また、コントロール (陰性対照) として試験培地のみを用いた。さらに、陽性対照としてグリシルプロリルイソロイシルグリシルセリン (先に提案したペントペプチド) を試験培地に溶解し、100 μM の試料を調製した。

【0051】

(ii) 毛包上皮細胞増殖試験

細胞を播種してから24時間後、培養液を除去し、培養細胞をMCDB153溶液で洗浄した。この培養細胞に前記の試料を100 μl ずつ各穴に加え、5% CO₂含有雰囲気中、37℃において培養した。

【0052】

4日後、アラマー・ブルー試薬 (登録商標名、バイオソース社製、カタログ番号DAL1100、ロット番号AB083002) を各穴ごとに10 μl ずつ添加し、再び5% CO₂雰囲気中、37℃において培養を継続した。2時間培養したのち、マイクロプレート

リーダー（ラボシステムズ社製、製品名「フルオロスキャンアセントFL」）で蛍光強度（励起波長；544 nm、測定波長；590 nm）を測定し、細胞数を評価した。

【0053】

なお、結果は、実施例1～4で得たペプチド及び陽性対照の細胞増殖度を、コントロールの細胞増殖度に対する比率（百分率）で算出し、細胞増殖比の平均値・標準偏差（ $n=5$ ）で表わした。有意差の検定は、ダネットの多重比較検定（アバカスコンセプト社製、ソフトウェア「スーパーアノヴァ V. 1. 11」）により行い、危険率5%未満（ $p<0.05$ ）の場合、有意差ありとした。このようにして得られたIGSの結果を図6に、PIGの結果を図7に、PIGSの結果を図8に、GPIGの結果を図9に、それぞれ棒グラフとして示す。

【0054】

(iii) 結果

図6より、IGSについては、0.3、1、3、10、30及び100 μ Mの細胞増殖率は、コントロール群と比較してそれぞれ98、103、106、124、134及び133%であり、10 μ M以上の濃度で有意差（すべて $p<0.01$ ）が認められた。

【0055】

図7より、PIGについては、0.3、1、3、10、30及び100 μ Mの細胞増殖率は、コントロール群と比較してそれぞれ101、103、113、132、131及び134%であり、1 μ M以上の濃度で有意差（3 μ M： $p<0.05$ ；10、30及び100 μ M： $p<0.01$ ）が認められた。

【0056】

図8より、PIGSについては、0.3、1、3、10、30及び100 μ Mの細胞増殖率は、コントロール群と比較してそれぞれ104、103、108、110、127及び133%であり、3 μ M以上の濃度で有意差（3及び10 μ M： $p<0.05$ ；30及び100 μ M： $p<0.01$ ）が認められた。

【0057】

図9より、GPIGについては、0.3、1、3、10、30及び100 μ Mの細胞増殖率は、コントロール群と比較してそれぞれ105、108、118、133、134及び138%であり、0.3 μ M以上の濃度で有意差（0.3 μ M： $p<0.05$ ；1、3、10、30及び100 μ M： $p<0.01$ ）が認められた。

【0058】

しかも、表皮細胞、真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞に対する試験を行ったところ、本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、表皮細胞に対しては毛包上皮細胞と同様に細胞増殖作用を示したものの、真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞に対しては何らの影響も与えないことが分かった。

【0059】

このように、本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、上皮系細胞に分類される毛包上皮細胞に対して選択的に細胞増殖作用を示すので、塗布剤例えばローション剤として用いた場合に、皮膚組織を構成する上皮系細胞以外の細胞に悪影響を及ぼさない。

【産業上の利用可能性】

【0060】

本発明の化合物は、上皮系細胞増殖促進剤として、育毛用、皮膚再生用に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】毛髪の発毛、脱毛のサイクルを示す説明図。

【図2】実施例1で得たトリペプチドのマススペクトル。

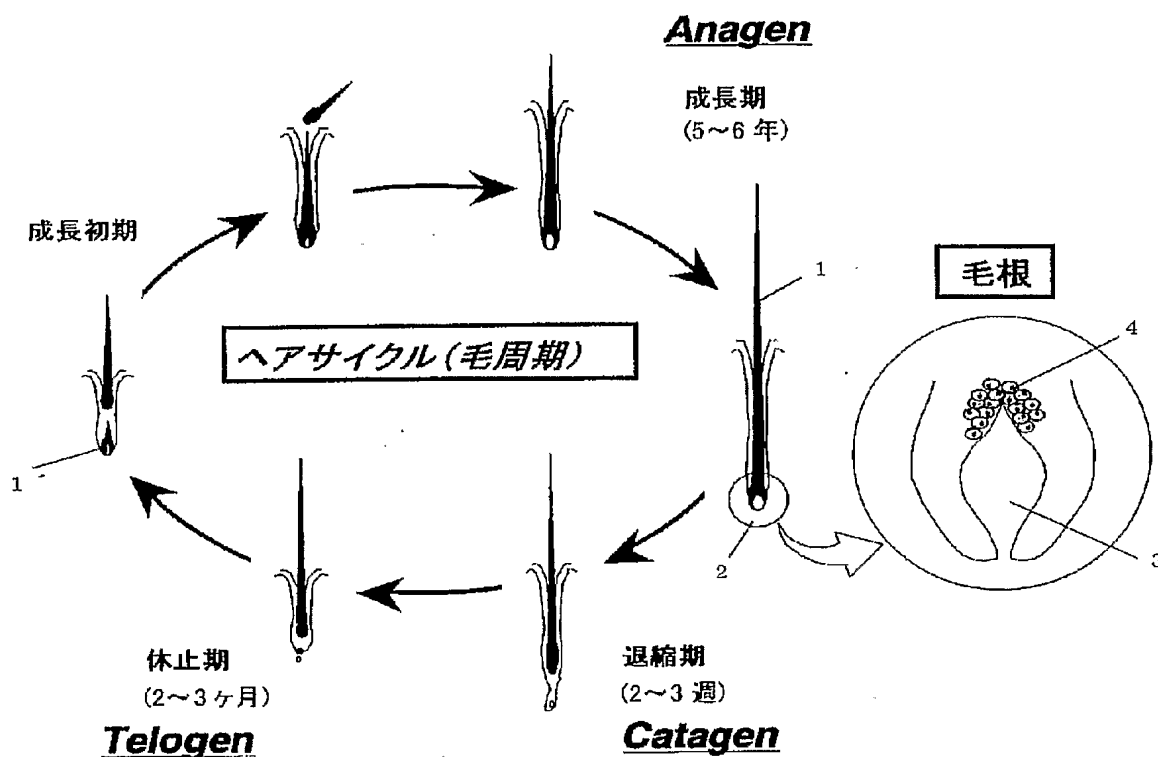
【図3】実施例2で得たトリペプチドのマススペクトル。

【図4】実施例3で得たテトラペプチドのマススペクトル。

【図5】実施例4で得たテトラペプチドのマススペクトル。

- 【図 6】 I G S の細胞増殖率を示す棒グラフ。
- 【図 7】 P I G の細胞増殖率を示す棒グラフ。
- 【図 8】 P I G S の細胞増殖率を示す棒グラフ。
- 【図 9】 G P I G の細胞増殖率を示す棒グラフ。

【書類名】 図面
【図 1】



【図 2】

Mass Spectrometry

Thermo

Sample: P182746_6 F1

Theoretical Mass [MW]: 275,307 Da

Expected Mass = [MW+1]

Filename: peptides023.613 12:53 Mon Mar 15 2004

Sample No: 86

Coarse Position: 45

Fine Position: 3

Laser Power: 78.00

Polarity: Positive

Operator: M. Lauster

Calibration: External

A: 0.1923

B/V: 0.180993

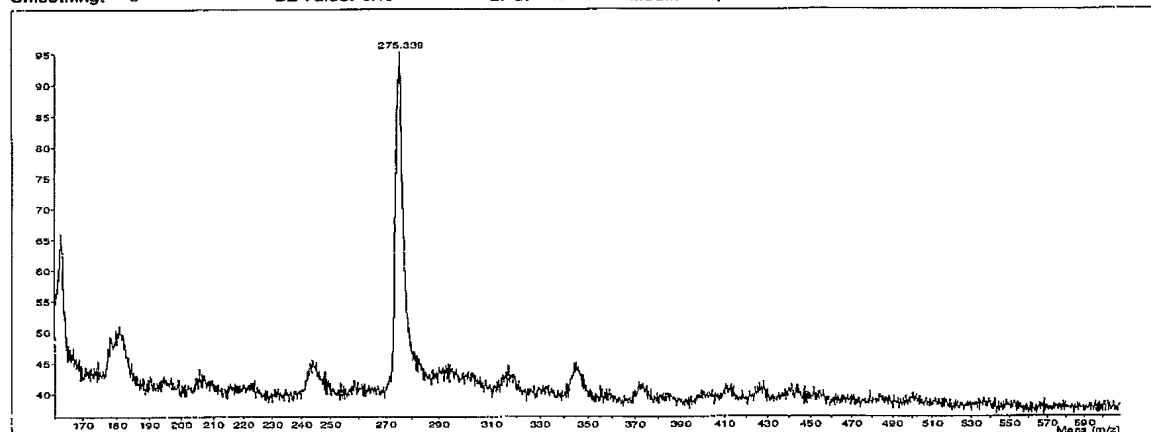
Smoothing: 0

DE Value: 0.10

EPG: ON

Mode: Peptide 500MHz

Summed: 20 shots



【図 3】

Mass Spectrometry

Thermo
ELECTRON CORPORATION

Quality Assurance Department
Mass Spectrometric Analysis

Sample: P182746_5 F1

Operator: M. Lauster

Theoretical Mass [MW]: 285,346 Da Expected Mass = [MW+1]

Filename: peptides023.508 16:48 Fri Mar 12 2004

Calibration: External

Sample No: 81 Coarse Position: 65 Fine Position: 9 Laser Power: 71.50 Polarity: Positive

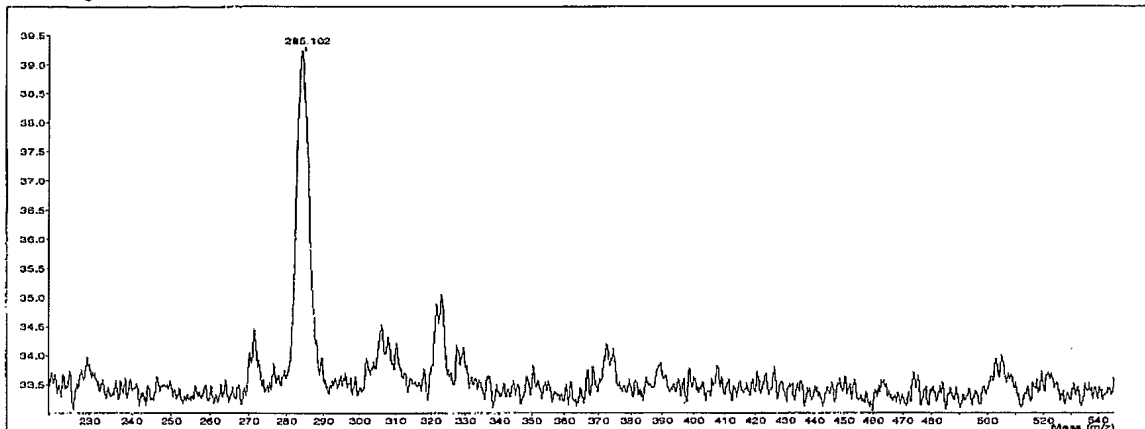
A: 0.3320 B/V: 0.183388

Smoothing: 5 DE Value: 0.10

EPG: ON

Mode: Peptide 500MHz

Summed: 20 shots



【図 4】

Mass Spectrometry

Thermo
ELECTRON CORPORATION

Quality Assurance Department
Mass Spectrometric Analysis

Sample: P182746_4 F1

Operator:

Theoretical Mass [MW]: 372,425 Da Expected Mass = [MW+1]

Filename: peptides023.506 16:39 Fri Mar 12 2004

Calibration: External

Sample No: 80 Coarse Position: 33 Fine Position: 4 Laser Power: 78.75 Polarity: Positive

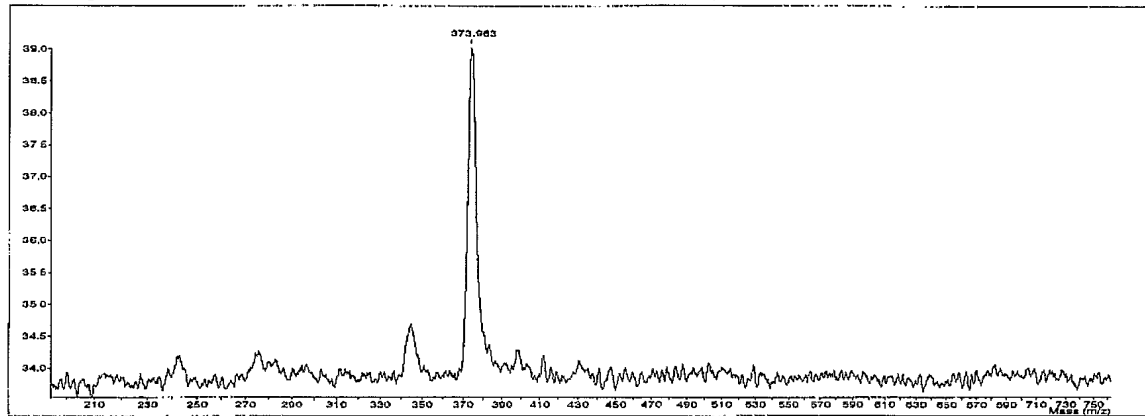
A: 0.2074 B/V: 0.180985

Smoothing: 9 DE Value: 0.10

EPG: ON

Mode: Peptide 500MHz

Summed: 40 shots



【図 5】

Mass Spectrometry

Thermo

ELECTRON CORPORATION

Quality Assurance Department
Mass Spectrometric Analysis

Sample: P182746_2 F1

Theoretical Mass [MW]: 342,399 Da

Expected Mass = [MW+1]

Operator: M. Lauster

Filename: peptides023.480 08:58 Fri Mar 12 2004

Calibration: External

Sample No: 55 Coarse Position: 22 Fine Position: 8 Laser Power: 78.00 Polarity: Positive

A: 0.2007 B/V: 0.181008

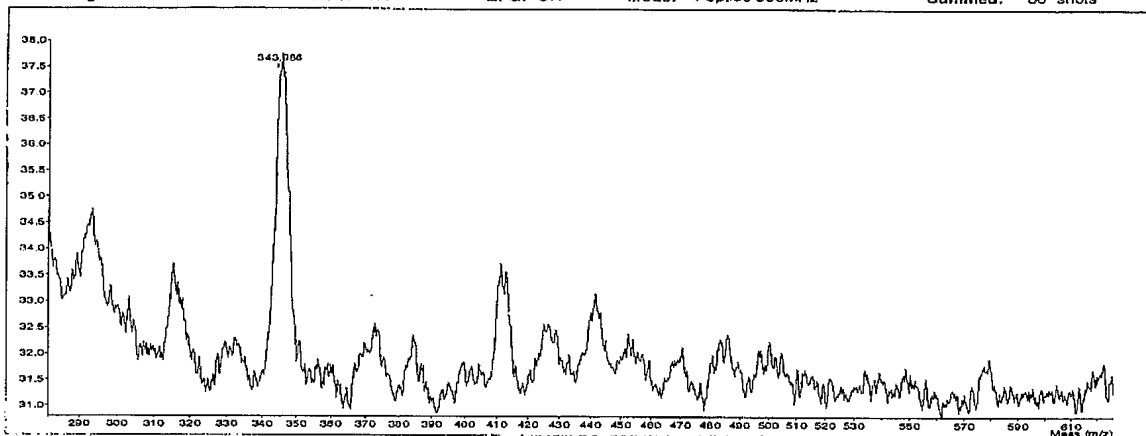
Smoothing: 5

DE Value: 0.10

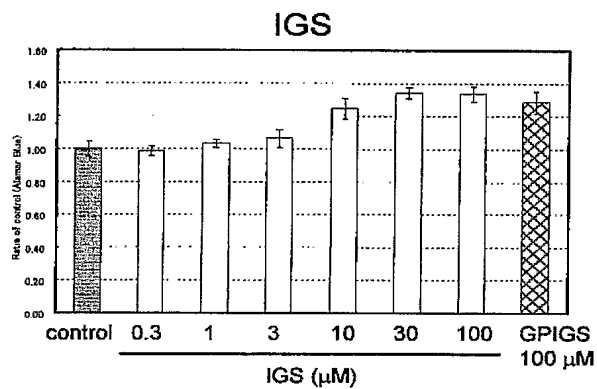
EPG: ON

Mode: Peptide 500MHz

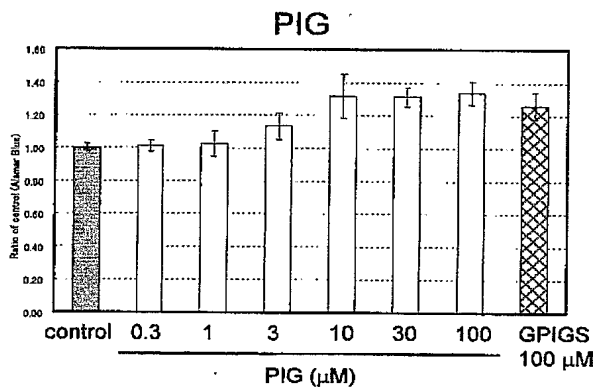
Summed: 30 shots



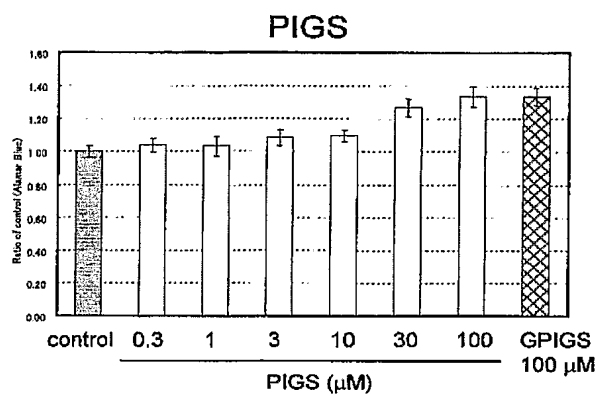
【図 6】



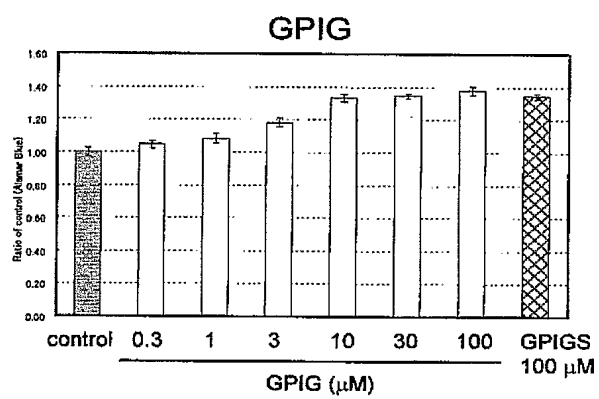
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 比較的簡単に製造することができ、育毛作用のみではなく、皮膚再生のような上皮系細胞増殖促進作用を有する上に、角質層を容易に通過して所望のターゲット細胞に達して効果を発揮し得る新規なオリゴペプチドを提供する。

【解決手段】 プロリルイソロイシルグリシル単位又はイソロイシルグリシルセリン単位を含むトリペプチド又はテトラペプチド及びそれらの塩とする。

【選択図】 なし

特願 2004-200862

出願人履歴情報

識別番号

[301021533]

1. 変更年月日

2001年 4月 2日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関1-3-1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

特願 2 0 0 4 - 2 0 0 8 6 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 2 3 1 6 7 0 6]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 8 月 3 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都新宿区余丁町 1 4 - 4 N H 市ヶ谷ビル 3 階

氏 名

特許技術開発株式会社